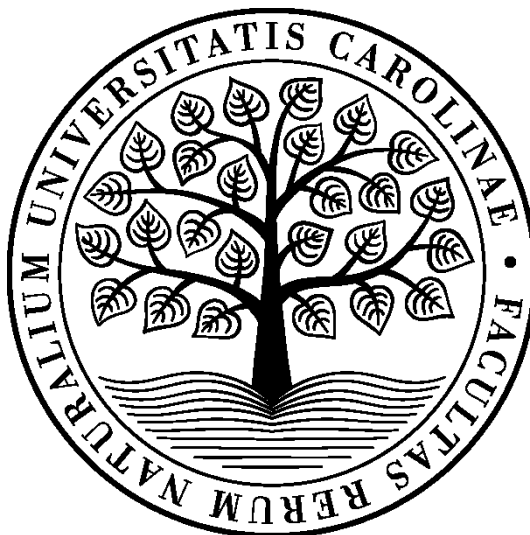


**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOCHEMIE



VOJTĚCH DUCHOSLAV

STUDIUM STRUKTURY TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ
REGULUJÍCÍCH METABOLISMUS PANKREATICKÝCH
BETA BUNĚK

STRUCTURAL STUDIES OF TRANSCRIPTION FACTORS
IMPLICATED
IN REGULATION OF METABOLISM OF PANCREATIC BETA
CELLS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Maloy Řezáčová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Václav Veverka, Ph.D.

PRAHA 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením své školitelky RNDr. Pavlíny Maloy Řezáčové, Ph.D. a konzultanta Ing. Václava Veverky, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 22. 5. 2019

Podpis:

Poděkování

Rád bych poděkoval mé školitelce RNDr. Pavlíně Maloy Řezáčové, Ph.D. za vlídnost, trpělivost, odborné vedení a velmi cenné rady během psaní bakalářské práce a během práce v laboratoři. Především bych chtěl poděkovat Ing. Václavovi Veverkovi, Ph.D. za umožnění pracovat pod jeho kontrolou, za velmi cenné rady během laboratorních prací i během psaní této práce. Velký dík patří Mgr. Kateřině Čermákové, Ph.D. za nesmírně cenné rady v laboratoři, v profesním životě a především v osobním životě. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Ireně Sieglové za jazykovou korekci a zasvěcení do laboratorních činností v mých začátcích, Mgr. Rozálii Hexnerové za pomoc s analýzou NMR spekter a korekci bakalářské práce a celému týmu Laboratoře strukturní biologie ÚOCHB za vytvoření výborného pracovního prostředí. Speciální dík patří RNDr. Milanovi Fábrymu, CSc. za přípravu expresních plazmidů a za řadu cenných životních rad. V neposlední řadě děkuji celé své rodině za zázemí a podporu v průběhu mých studijních let. Zejména mému bratrovi Ing. Jiřímu Duchoslavovi, Ph.D. za jeho pomocnou ruku, o kterou se mohu vždy opřít.

Abstrakt

Nkx6.1 je homeodoménový protein o velikosti 37,8 kDa a důležitý transkripční faktor regulující transkripci významných genů beta pankreatických buněk. Nedostatečná exprese tohoto proteinu vede k porušené transkripci glukozového přenašeče Glut2, jejímž důsledkem je snížené vychytávání glukózy z krve a narušení celého metabolismu glukózy. Dále je potlačena proliferace beta pankreatických buněk kvůli nízké transkripci mitogenu cyclin D2 spouštějícího mitotické dělení buněk. V neposlední řadě se vážně naruší biosyntéza inzulinu špatnou transkripcí genů pro proteiny Erol1b a Slc30a8, což vede k poklesu jeho produkce.

Nkx6.1 hraje roli v patogenezi cukrovky druhého typu. Při tomto onemocnění vykazují beta buňky zmenšenou schopnost kompenzovat zvýšený požadavek na produkci inzulinu. Důvodem je nízká sekrece inzulinu a smrt beta pankreatických buněk. Jedna z možných příčin může být špatná regulace transkripce genů, účastnících se zmíněných procesů.

Nkx6.1 rozeznává vysoce konzervovanou oligonukleotidovou sekvenci DNA (TTAATTAC). Vazba k DNA je navíc regulována doménou se zvýšeným výskytem kyselých aminokyselinových zbytků na karboxylovém konci molekuly.

V rámci bakalářské práce byly přiřazeny rezonance atomů hlavního řetězce proteinu Nkx6.1 pomocí metody nukleární magnetické rezonance (NMR). K tomuto účelu byl připraven rekombinantní protein s izotopovým obohacením ^{13}C a ^{15}N . Znalost rezonančního přiřazení hlavního řetězce proteinu umožnila ověřit vazbu proteinu na DNA a též sledovat efekt vazby DNA na strukturu Nkx6.1.

Biofyzikální charakterizace proteinu Nkx6.1 provedená v rámci této práce přispěje k lepšímu porozumění vazebného mechanismu na molekulární úrovni a v budoucnu k pochopení funkce tohoto proteinu pro proliferaci pankreatických buněk a k jejímu ovlivnění.

Klíčová slova: transkripční faktor, β -pankreatické buňky, cukrovka, strukturní biologie

Abstract

Nkx6.1 is a homeodomain protein (37.8 kDa) and an important transcription factor, which regulates transcription of key genes in pancreatic β -cells. Insufficient expression of this protein leads to reduced glucose uptake from blood as a consequence of suppressed transcription of the glucose transporter Glut2 and impaired glucose metabolism. Furthermore, the proliferation of pancreatic β -cells is suppressed due to insufficient transcription of Cyclin D2, a protein regulating the mitosis. Moreover, the biosynthesis of insulin is impaired due to the diminished transcription of the genes coding for Ero1b and Slc30a8, which as a consequence leads to reduced production of the mature insulin.

Nkx6.1 could play a role in the pathogenesis of the type 2 diabetes, where β -cells show diminished ability to compensate high demand for insulin. This malfunction is the cause of an insufficient ability to secrete insulin and death of pancreatic cells. Perhaps driven by misregulation of transcription of the genes that are involved in the mentioned processes.

Nkx6.1 recognizes a strictly conserved 8-base pair DNA sequence (TTAATTAC). Its binding to DNA is regulated by an acidic domain at the C-terminus.

Within the bachelor thesis, the resonances were assigned to the backbone atoms of the Nkx6.1 protein using nuclear magnetic resonance spectroscopy. For this purpose, this protein was recombinantly prepared using the isotope labeling with ^{13}C and ^{15}N . The knowledge of the resonance assignment of the protein backbone allowed the investigation of the binding effect of DNA on Nkx6.1.

Biophysical characterization of the Nkx6.1 protein will contribute to better understanding of the binding mechanism on a molecular level and for understanding the function of this protein in β cells proliferation and might facilitate the restoration of the pancreatic β -cells functionality.

(In Czech)

Key words: transcription factor, pancreatic β -cells, diabetes, structural biology

Seznam použitých symbolů a zkratk

(v/v)	Objemová procenta
(w/v)	Procenta hmotnosti v objemu
^1H - ^{13}C HSQC	Z angl. ^1H - ^{13}C Heteronuclear Single-Quantum Correlation
^1H - ^{15}N HMBC	Z angl. ^1H - ^{15}N Heteronuclear Multi-Bond Correlation
^1H - ^{15}N HSQC	Z angl. ^1H - ^{15}N Heteronuclear Single-Quantum Correlation
$A_{280\text{nm}}$	Absorbance při vlnové délce 280 nm
AV ČR	Akademie věd České republiky
CBCA(CO)NH	Název spektra odpovídá skupinám generujícím signál
ccnd2	Gen kódující mitogen Cyclin D2
Cyclin D2	Mitogen spouštějící mitotické dělení beta pankreatických buněk
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
EMSA	Metoda na detekci protein-DNA interakcí (z angl. electrophoretic mobility shift assay)
Ero1b	Protein zapojený do biosyntézy inzulinu
ETG	Ethyl- β -D-thiogalaktosid
FPLC	Provedení kapalinové chromatografie (z angl. fast protein liquid chromatography)
Gck	Glukokinasa
Glut2	Glukózový transportér
HD	Homeodoména (z angl. homeodomain)
HLH	Doména typu Helix-smyčka-helix (z angl. helix-loop-helix)
HMG	Doménová skupina s vysokou pohyblivostí (z angl. high mobility group)
HMGA	Podrodina doménové struktury zhrnující háček AT (z angl. high mobility group)
HMGB	Podrodina doménové struktury zahrnující box (z angl. high mobility group box)
HMGN	Podrodina doménové struktury zahrnující nukleosomální vazebnou doménu (z angl. high mobility group)
HN(CA)CO	Název spektra odpovídá skupinám generujícím signál
HNCACB	Název spektra odpovídá skupinám generujícím signál

HNCO	Název spektra odpovídá skupinám generujícím signál
HTH	Doména typu helix-otočka-helix (z angl. helix-turn-helix)
KATP	ATP-dependentní draslíkový kanálek
Lac	Represorový protein lac
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
Nkx6.1	Homeoboxový protein
NMR	Nukleární magnetická resonance (z angl. nuclear magnetic resonance)
OD _{550nm}	Optická hustota při vlnové délce 550 nm
p1299	Plazmid k expresi Nkx6.1
Pcx	Pyruvát karboxyláza
PDB	Proteinová databáze (z angl. protein data bank)
pH	Vodíkový exponent (z angl. potential of hydrogen)
Plac ^{UV5}	Promotor
ppm	Část z milionu (z angl. part per milion)
RNA	Ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
rpm	Otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS-PAGE	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SfiI	Endonukleasa
Slc30a8	Gen pro biosyntézu inzulinu
T2D	Cukrovka druhého typu (z angl. type 2 diabetes)
T7	Typ fága
TALOS+	Program pro výpočet dihedrálních úhlů hlavního řetězce proteinů
TEV PR	Proteáza viru tabákové mozaiky (z angl. Tobacco Etch Virus)
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina (z angl. transfer ribonucleic acid)
UL42	Typ Herpes Simplex Viru
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
v.v.i.	Veřejná výzkumná instituce
ZF	Doména typu zinkový prst (z angl. zinc finger)

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Seznam použitých symbolů a zkratk.....	5
Obsah	7
1. Úvod.....	9
1.1. Regulace eukaryotní transkripce	9
1.2. Obecné transkripční faktory	11
1.3. Mechanizmy rozpoznávání DNA.....	12
1.3.1. Helix-otočka-helix.....	13
1.3.2. Skupiny proteinů s vysokou mobilitou.....	14
1.3.3. Proteiny s homeodoménou	14
1.3.4. Helix-smyčka-helix proteiny	14
1.3.5. Zinkový prst	15
1.4. Nkx6.1	16
1.5. Funkce Nkx6.1 v beta pankreatických buňkách	16
2. Cíl.....	19
3. Materiál a metody	20
3.1. Materiál	20
3.1.1. Chemikálie.....	20
3.1.2. Enzymy a oligonukleotidy.....	22
3.1.3. Bakteriální kmeny a expresní plazmidy	22
3.1.4. Použité pufrý a media	22
3.1.5. Ostatní materiál	23
3.1.6. Přístroje	24
3.2. Metody	26
3.2.1. Transformace bakterií plazmidovou DNA	26
3.2.2. Heterologní exprese Nkx6.1	26
3.2.3. Heterologní exprese izotopově obohaceného ^{13}C - ^{15}N Nkx6.1.....	27
3.2.4. Disrupce buněk.....	27

3.2.5.	Elektroforéza	27
3.2.6.	Chromatografické metody	28
3.2.7.	Příprava oligonukleotidového duplexu DNA.....	29
3.2.8.	NMR spektroskopie.....	30
4.	Výsledky	31
4.1.	Příprava a biofyzikální charakterizace Nkx6.1 ₍₂₂₆₋₃₁₂₎	31
4.2.	Příprava ¹³ C- ¹⁵ N izotopově obohaceného Nkx6.1 ₍₂₂₆₋₃₁₂₎ a přiřazení rezonancí hlavního řetězce	34
4.3.	Interakce fragmentu DNA s Nkx6.1 ₍₂₂₆₋₃₁₂₎	37
5.	Diskuze	40
6.	Závěr	42
7.	Seznam použité literatury	43

1. Úvod

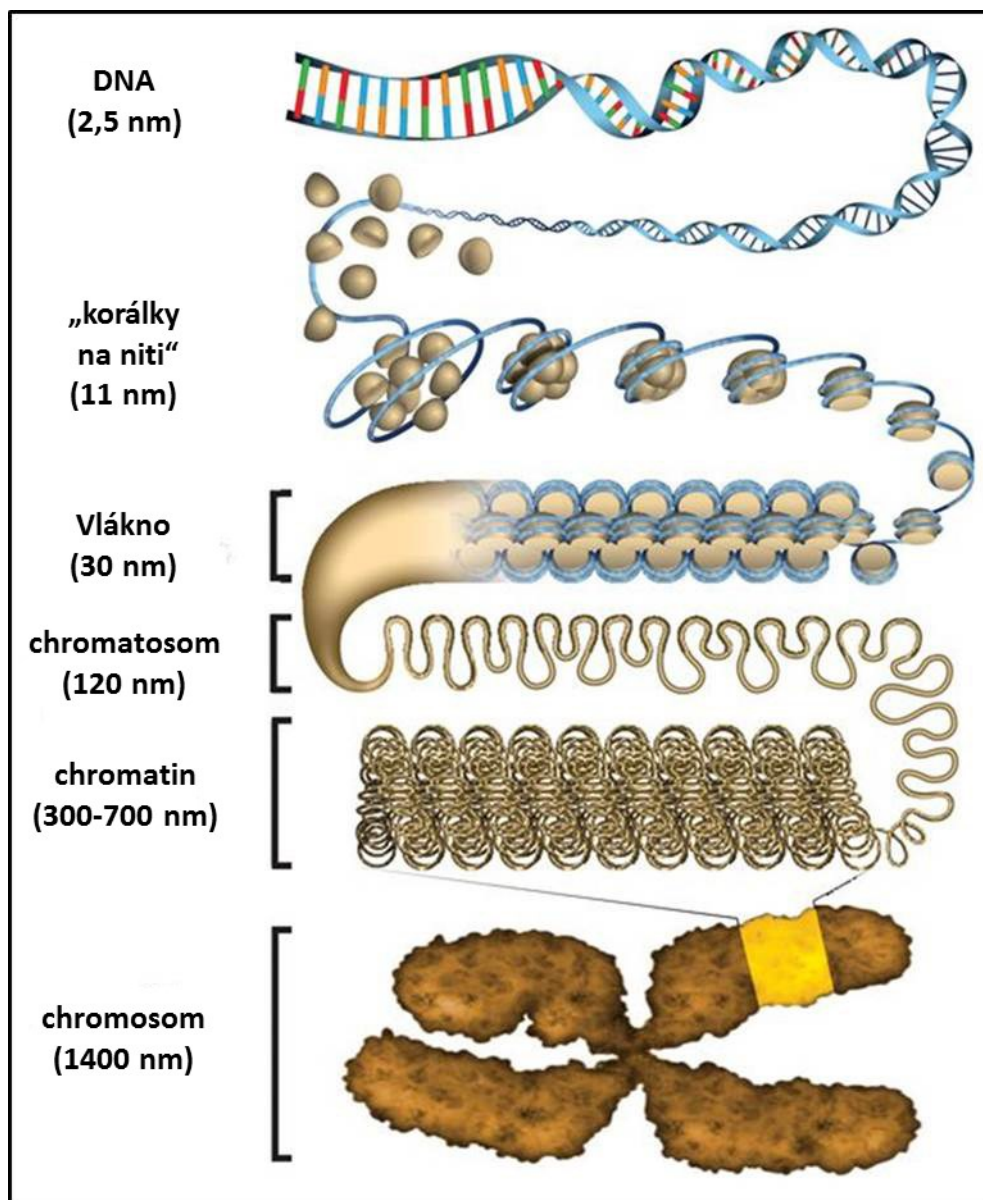
Deoxyribonukleová kyselina – DNA (z angl. deoxyribonucleic acid) je nositelkou genetických informací, které jsou zapsané v genech pomocí pořadí jednotlivých bází. V eukaryotické jaderné DNA se kromě aktivně přepisovaných úseků, kódujících určitou genetickou informaci (tzv. exony), nacházejí také úseky, které nejsou aktivně přepisovány (tzv. introny).

Aby se příslušná genetická informace v organismu projevila, musí dané geny kódující specifické proteiny projít procesy zvanými transkripce a translace. Transkripce neboli přepis genetické informace z DNA do ribonukleové kyseliny – RNA (z angl. ribonucleic acid) i translace neboli překlad genetické informace z mRNA na protein, jsou velmi komplexní procesy regulované řadou regulačních faktorů.

Nkx6.1 je důležitým faktorem regulujícím transkripci v Langerhansových ostrůvcích beta pankreatických buněk. Váže se na inzulinový promotor a ovlivňuje transkripci inzulinového genu [1].

1.1. Regulace eukaryotní transkripce

V eukaryotní buňce se jednotlivé lineární dvoušroubovice DNA skládají, neboli kondenzují, do supramolekulárních struktur nazývaných chromosomy (Obrázek 1, str. 10) Sbalení do této supramolekulární struktury ovšem nesmí omezovat transkripci a translaci. Části chromosomu musí být tedy stericky dostupný pro enzymy a faktory, které jsou zásadní pro zmíněné procesy [2].



Obrázek 1 Schematické zobrazení geneze skládání molekuly DNA do supramolekulární struktury chromosomu. Obrázek byl upraven dle [3].

Základní stavební složkou chromosomů jsou nukleosomy, kolem kterých je obtočena dvoušroubovice DNA. Nukleosomy jsou tvořeny komplexy proteinů zvaných histony. Kolem každého nukleosomu se obtáčí 146 párů bází, což představuje 1,75 otáčky dvoušroubovice DNA. Na nukleosom se váže histon H1, který slouží jako jakýsi klín bránící rozmotání dvoušroubovice. Celý tento útvar se označuje chromatosom. Mezi jednotlivými chromatosomy jsou mezery nezkondenzované dvoušroubovice o délce přibližně 10 až 100 párů bází. Celý tento řetězec složený z chromatosomů tvoří chromatinové vlákno, které další kondenzací do vyšších struktur vytváří finální strukturu chromosomu [4].

Před začátky aktivně přepisovaných genů se nachází oblasti, které zajišťují jejich správné nalezení, takzvané promotory. RNA-polymerasa II rozpoznává svou podjednotkou σ tyto promotorové oblasti a po navázání na promotor se přesunuje k začátku genu, kde zahájí proces transkripce. Na promotor se mohou vázat další bílkoviny nazývané represory, které znemožňují navázání RNA-polymerasy II, a tím přepis genu. Naopak proteiny zvané aktivátory usnadňují navázání polymerasy na promotor. Tímto buňka proces transkripce částečně reguluje. Samotný proces transkripce začíná rozrušením vodíkových můstků, stabilizujících sekundární strukturu DNA dvoušroubovice, čímž vzniká transkripční “bublina”, kde probíhá transkripce. Podél rozpleteného vlákna DNA se na základě komplementarity bází tvoří nové vlákno RNA ve směru 5' – 3' nazývané transkript. Jakmile RNA-polymerasa II narazí na úsek bohatý na opakující se A-T páry, vlásenkové struktury či ρ -protein (Rho protein), značí to terminační sekvenci, a tedy konec transkripce genu. Vlásenkové struktury a Rho-protein hrají funkci jakési mechanické zarážky, přes kterou RNA-polymerasa II neprojde a nemůže tedy dále pokračovat v přepisu genu. Enzym disociuje od DNA a transkripce je ukončena [5].

1.2. Obecné transkripční faktory

Ke správnému zahájení transkripce je potřeba nasednutí RNA polymerasy II na promotor nacházející se krátce před iniciačním místem genů. Celý proces nasednutí RNA-polymerasy II na promotor a zahájení transkripce je velmi složitý a vyžaduje přítomnost několika obecných transkripčních faktorů [2].

Promotorová oblast genu se může v chromatinové struktuře nacházet ve volné, stericky dostupné části mezi jednotlivými nukleosomy, nebo může být kondenzována v nukleosomu. V případě, že je promotor stericky nedostupný pro nasednutí RNA-polymerasy II, musí se struktura nukleosomů částečně rozvolnit. Rozvolnění struktury je zprostředkováváno velmi komplexními mechanismy, které zahrnují více transkripčních faktorů najednou [6, 7]. Příkladem dílčích kroků mechanismů, které buňka využívá je například přenos methylové skupiny z adenosylmethioninu na lysinové a argininové zbytky histonů. Daleko významnější modifikací je přenos acetylové skupiny z acetyl-CoA na lysinové zbytky histonů čím se neutralizuje kladný náboj a dojde ke snížení afinity histonů k molekule DNA, a tedy lokálnímu uvolnění z nukleosomu. Další modifikací histonů, kterou buňka využívá k disociaci DNA z nukleosomů, je připojení fosfátové skupiny na serinové a threoninové zbytky [5].

Na základě *in vitro* pokusů bylo zjištěno, že RNA-polymerasa II není schopná zahájit transkripci bez přítomnosti obecných transkripčních faktorů [5]. K zahájení transkripce je třeba vytvoření iniciačního transkripčního komplexu. Tento komplex je výsledkem součinností různých obecných transkripčních faktorů. Kromě obecných transkripčních faktorů se do procesu transkripce zapojují také specifické transkripční faktory vyhledávající konkrétní geny k přepisu [5].

1.3. Mechanizmy rozpoznávání DNA

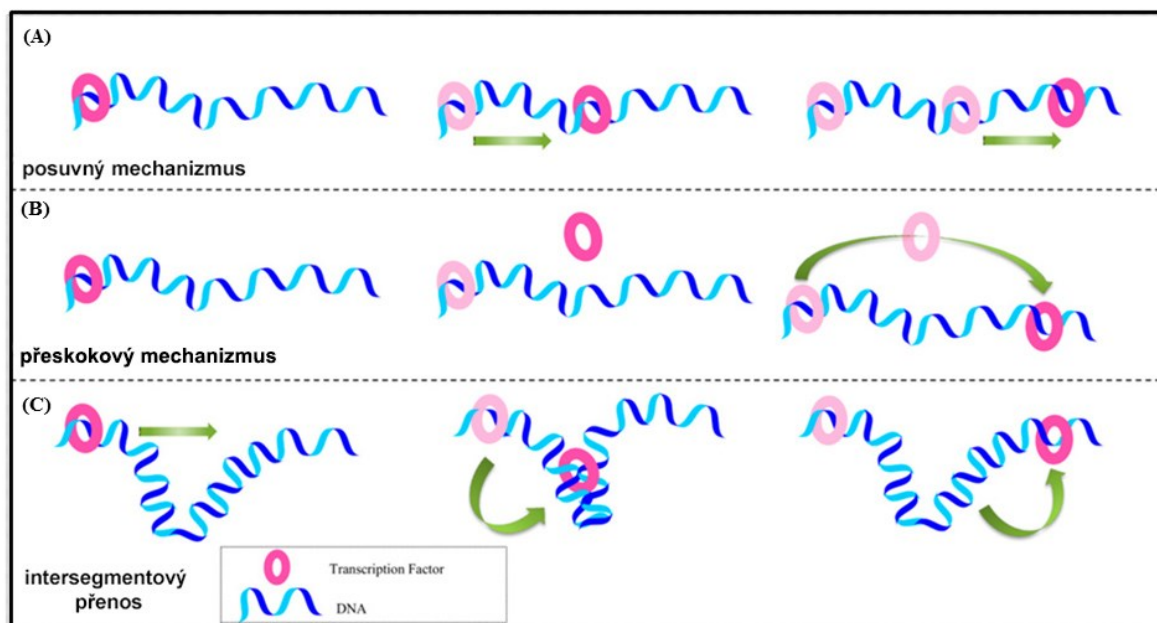
Proteiny k rozpoznání DNA používají širokou škálu strukturních motivů. Jsou jimi například homeodomény typu helix-otočka-helix (HTH, z angl. helix-turn-helix) a box pro skupinu s vysokou pohyblivostí (HMG, z angl. high mobility group). HTH je nejčastějším DNA-vazebným motivem, který můžeme nalézt v řadě proteinů, které mají funkci represorů anebo aktivátorů. Některé DNA-vazebné proteiny obsahují flexibilní segmenty mimo strukturní doménu vázající DNA, a tyto využívají k regulaci interakcí s DNA. Například transkripční regulátor p4 fága $\phi 29$ využívá pro specifický kontakt s DNA svou „beta-otočka“ sekundární strukturu na N-konci molekuly [8]. Podobně další homeodoménové proteiny využívají své N-koncové či C-koncové sekvence molekul k regulaci vazby na DNA. Tyto segmenty většinou kompetují s DNA. Také Nkx6.1 využívá svůj C-konec k regulaci vazby na DNA [9, 10].

Bylo navrženo několik mechanismů, jak transkripční faktory naleznou své vazebné místo na DNA. Prvním je takzvaný „posuvný mechanismus“ (Obrázek 2 (A), str. 13). V tomto mechanismu se transkripční faktor posunuje z počátečního nespecifického místa po DNA, až nalezne své cílové místo vazby. Názorným příkladem posuvného mechanismu je rozpoznávání DNA Lac represorem [11-13]. Rychlost posuvu je mimo jiné závislá na hydrodynamickým poloměrem proteinu [9].

Druhou možností je takzvaný „přeskokový mechanismus“ (Obrázek 2 (B), str. 13), kdy může transkripční faktor přeskóčit z místa na místo tak, že disociuje od původního místa a následně se naváže na místo nové. Tento přeskok se může uskutečnit na stejném řetězci v blízkosti původního vazebného místa. Přeskokový mechanismus je pravděpodobně pomalejší než posuvný mechanismus, neboť závisí na disociaci a následném opětovném navázání k jinému místu [14].

Třetí možností vazby transkripčního faktoru je mechanismus přenosu mezi segmenty (Obrázek 2 (C), str. 13), navržený Bergem a von Hippem [15]. V tomto

případě se transkripční faktor pohybuje mezi dvěma místy prostřednictvím smyčky z DNA a následně se váže na dvě různá místa DNA. Mechanismus je aplikovatelný pro transkripční faktory se dvěma DNA vazebnými místy. Příkladem jsou Lac represor nebo SfiI endonukleasa [16]. Transkripční faktory se dvěma DNA vazebnými místy se mohou příležitostně nespecificky vázat na dvě místa DNA, která jsou jinak v řetězci velmi daleko od sebe. Díky tvorbě smyček jsou tato dvě vzdálená místa přivedena do těsného kontaktu [15, 17, 18].



Obrázek 2 Schema možných mechanismů pro rozpoznání vazebného místa na DNA transkripčním faktorem. (A) posuvný mechanismus, (B) přeskokový mechanismus a (C) přenos mezi segmenty. Obrázek byl upraven dle [9].

1.3.1. Helix-otočka-helix

Helix-otočka-helix (HTH) je nejjednodušším DNA vazebným motivem tvořeným dvěma α -helikálními strukturami spojenými otočkou (Obrázek 3 (A) str. 15). Obecně mají proteiny se strukturním motivem HTH tendenci vytvářet oligomery, většinou dimery či tetramery. Každý monomer identifikuje a váže jednu stranu symetrické DNA sekvence [19]. Rozpoznávající α -helix (většinou ten druhý) motivu HTH se váže do velkého žlábků vodíkovými vazbami, zatímco ostatní α -helixy se podílejí na udržování stability komplexu DNA-protein.

1.3.2. Skupiny proteinů s vysokou mobilitou

Skupiny proteinů s vysokou mobilitou, HMG zahrnují velkou řadu jaderných proteinů, které se váží na nukleosomy a indukují strukturní změny chromatinu. Tyto proteiny hrají důležitou roli v procesech transkripce, replikace, rekombinace a opravy DNA. HMG proteiny jsou schopné zaujímat různé prostorové struktury a jedinečné motivy, díky kterým se mohou vázat a ovlivňovat chromatinová vlákna. Vazba HMG proteinů je velmi dynamická a není omezena na specifické místo. HMG proteiny se rozdělují do tří podrodin: HMGA, HMGB a HMGN. Doménové struktury těchto podrodin HMG zahrnují buď háček AT (HMGA), HMG-box doménu (HMGB) nebo HMG nukleosomální vazebnou doménu (HMGN). Každá podrodina má jedinečný funkční motiv, který způsobuje specifické změny v místě vazby s DNA a celkově se podílí na odlišných buněčných funkcích [20]. Příklad HMG domény je na Obrázku 3 (B), str. 15.

1.3.3. Proteiny s homeodoménou

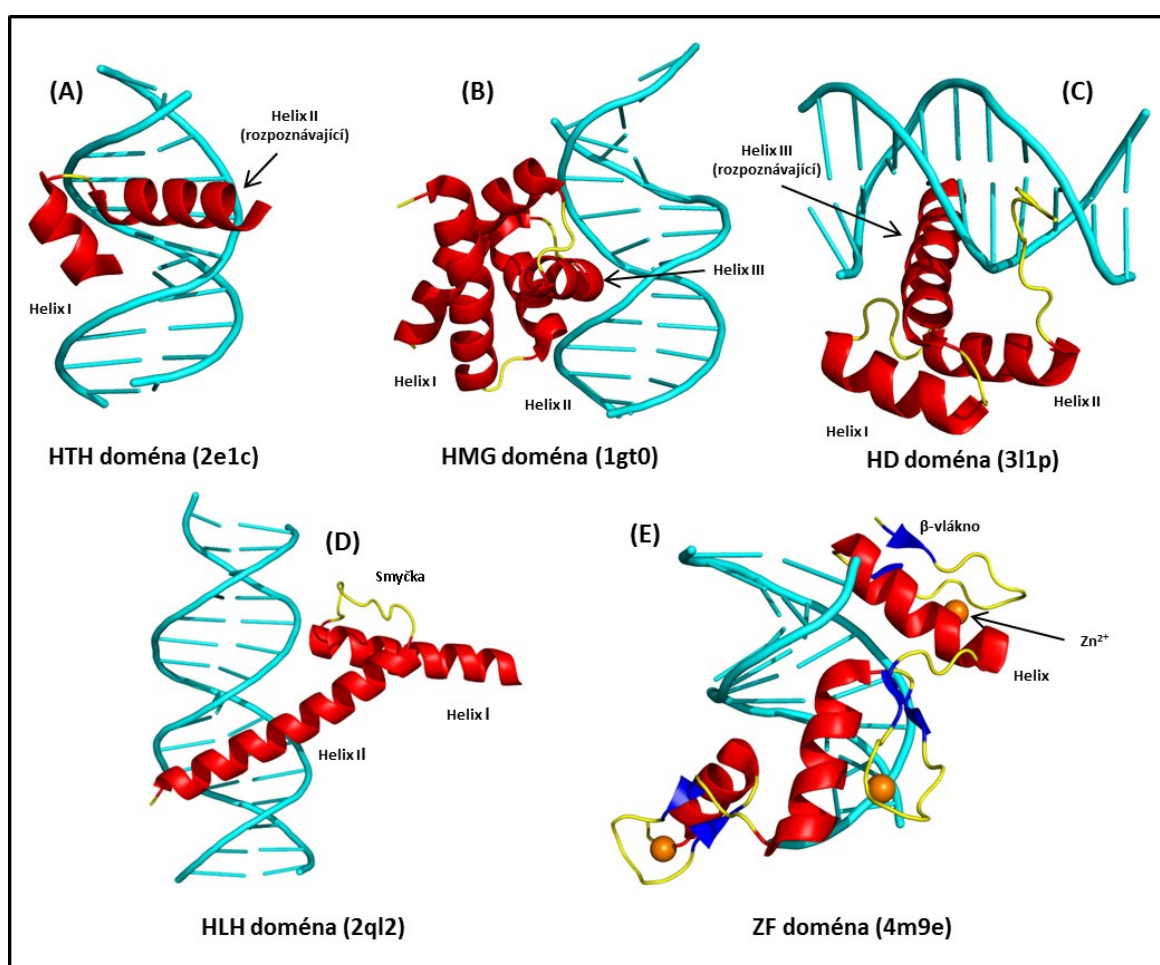
Homeodomény (HD) jsou konzervované domény tvořené třemi α -helixy. Obsahují přibližně 60 aminokyselinových zbytků. Orientace α -helixu 1 a α -helixu 2 je antiparalelní s α -helixem 3 ležícím napříč (Obrázek 3 (C), str. 15). Právě α -helix 3 je rozpoznávací helix, který interaguje s DNA. Homeodomény jsou schopny vázat uzavřené chromatinové struktury a umožňují tak vazbu koaktivátoru potřebného k expresi genu. Homeodoménové proteiny a HMG domény obsahují podobné strukturní uspořádání motivu vázajícího DNA a patří do nadřazené rodiny HTH.

1.3.4. Helix-smyčka-helix proteiny

Rodina helix-smyčka-helix (HLH, z angl. helix-loop-helix) transkripčních faktorů obstarává většinou kontrolu buněčného cyklu a diferenciace buněk. Vysoce konzervovaná oblast HLH je tvořena dvěma α -helixy, dlouhými asi 15-20 aminokyselinových zbytků. Tyto dva helixy jsou odděleny krátkou smyčkou o různé délce (Obrázek 3 (D), str. 15) [21]. HLH domény zprostředkovávají homo- nebo heterodimerizaci, čímž hrají důležitou roli ve vazbě DNA a v regulaci transkripce [22]. Většina členů HLH rodiny obsahuje bazické aminokyselinové zbytky v blízkosti HLH domény, které usnadňují vazbu DNA.

1.3.5. Zinkový prst

Zinkový prst (ZF, z angl. zinc finger) je velmi rozšířená doménová struktura přítomná ve 3 procentech genů lidského genomu. Typický zinkový prst obsahuje dva histidinové a dva cysteinové aminokyselinové zbytky koordinující zinečnatý ion. Je složený z α -helixu a antiparalelního β -vlákna (Obrázek 3 (E), str. 15). Čtyři klíčové aminokyselinové zbytky umístěné ve specifických pozicích na špičce prstu, jsou odpovědné za rozpoznávání cílového úseku DNA a za interakci s velkým žlábkem, která je zprostředkována vodíkovými vazbami [23]. Záměna klíčových aminokyselinových zbytků má velký vliv na rozpoznávání DNA sekvencí.



Obrázek 3 Struktury vazebných domén transkripčních faktorů. V závorkách jsou uvedeny kódy struktur uložených v PDB databázi. (A) Helix-otočka-helix (HTH), (B) skupina s vysokou mobilitou (HMG), (C) homeodoména (HD), (D) helix-smyčka-helix (HLH), (E) zinkový prst (ZF). Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL verze 1.5.0.1 (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA)

1.4. Nkx6.1

Nkx6.1 je protein exprimovaný ve zralých Langerhansových ostrůvcích beta pankreatických buněk a slouží jako diferenciační faktor. Jeho primární sekvenci tvoří 367 aminokyselinových zbytků a celkové molekulové váze 37,8 kDa. Ve své sekvenci obsahuje homeodoménu, která je tvořena aminokyselinovými zbytky L229 – K305 a na C-konci má úsek Q306 – S367, jenž je bohatý na kyselé aminokyselinové zbytky. Umístění homeodomény je schématicky znázorněno na Obrázku 4 (B), str. 18.

K pochopení toho, jak Nkx6.1 přispívá k vývoji a funkci beta pankreatických buněk, je třeba charakterizovat jeho interakci s DNA. Homeodoména Nkx6.1 se váže na oligonukleotidovou sekvenci TTAATTAC nacházející se v promotorové oblasti genů. Vazebná sekvence byla identifikována metodou EMSA [24, 25]. Dále bylo zjištěno, že vazbu Nkx6.1 k DNA neovlivňuje pouze homeodoména proteinu. Vazebná afinita interakce celého proteinu k DNA byla výrazně nižší, nežli vazba homeodomény samotné. Delece karboxylového konce, nebo mutace v tomto regionu výrazně zvýšila vazebnou afinitu. Na základě těchto zjištění lze usuzovat, že interakci mezi DNA a homeodoménou ovlivňuje C-konec proteinu, tedy sekvence se zvýšeným výskytem kyselých aminokyselinových zbytků [10].

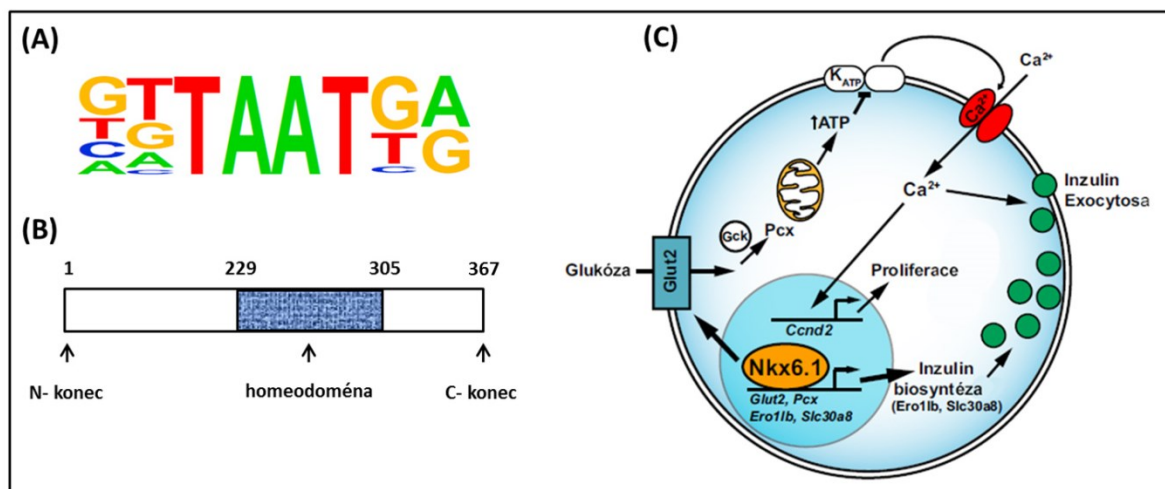
Interakce záporně nabitě domény na C konci může rozrušit elektrostatickou vazbu mezi pozitivně nabitou DNA-vazebnou doménou a záporně nabitými fosfátovými skupinami hlavního řetězce DNA [10]. Anebo by zeslabování vazby homeodomény k DNA C-koncem proteinu mohlo být způsobeno interakcí s dalšími proteiny, které se váží nedaleko, nebo jsou součástí transkripčního regulačního komplexu. V tomto případě by Nkx6.1 zasahoval pouze geny, které rovněž obsahují vazebná místa pro příslušné proteiny, a to pouze v buňkách, které tyto proteiny exprimují [10].

1.5. Funkce Nkx6.1 v beta pankreatických buňkách

V beta pankreatické buněčné linii Nkx6.1 funguje jako represor rozeznávající promotorové oblasti genů s konzervovanou oligonukleotidovou sekvencí. Nejvíce konzervovaná oblast sekvence je její střední část, tvořená bázemi TAAT (Obrázek 4 (A), str. 18). Nkx6.1 přímo reguluje transkripci genů, které kódují proteiny zprostředkovávající následující funkce: vychytávání glukózy z krve (Glut2), metabolismus glukózy (Pcx),

biosyntézu inzulinu (Ero1lb a Slc30a8) a mitotické dělení (Cyclin D2). Snížená exprese Nkx6.1 v beta pankreatických buňkách má níže popsané nežádoucí důsledky. Například snížené vychytávání glukózy a její metabolismus má za následek sníženou produkci ATP, což vede k narušení inzulinové sekrece. Vychytáváním glukózy skrze glukózový přenašeč Glut2 Nkx6.1 nepřímo řídí dělení beta pankreatických buněk. Při nedostatečném množství Nkx6.1 je snížena exprese genu *ccnd2*, který kóduje mitogen Cyclin D2 spouštějící mitotické dělení buněk. V tomto případě je schopnost dělení beta pankreatických buněk potlačena. V poslední řadě se vážně naruší biosyntéza inzulinu, což vede ke snížení produkce zralého inzulinu. Schéma funkcí Nkx6.1 ve zralých beta pankreatických buňkách je na Obrázku 4 (C), str. 18.

Nkx6.1 by mohl mít úlohu v rozvoji cukrovky druhého typu (T2D). T2D je metabolická porucha charakterizovaná zvýšenou hladinou cukru v krvi, nízkou produkcí inzulinu a jeho nedostatečnou citlivostí na glukózu [1]. V T2D vykazují beta buňky sníženou schopnost kompenzovat zvýšený požadavek na inzulin. Příčinou je nedostatečná schopnost vylučovat inzulin a smrt beta pankreatických buněk. Tyto poruchy mohou být způsobeny špatnou regulací transkripce genů účastnících se zmíněných procesů [1]. Genomové studie potvrdily, že snížená exprese Nkx6.1 u myši a lidí byla doprovázena vývojem T2D [26]. *In vitro* pokusy na izolovaných Langerhansových ostrůvcích beta pankreatických buněk ukázaly, že snížená sekrece inzulinu při zvýšené hladině glukózy v krvi a nedostatečná proliferace beta pankreatických buněk je způsobena sníženou expresí Nkx6.



Obrázek 4 (A) DNA motiv rozeznávaný homeodoménou Nkx6.1. Velikost písmen je přímo uměrná konzervovanosti dané báze. (B) Doménová organizace proteinu Nkx6.1. (C) Schéma funkcí Nkx6.1 v dospělé beta pankreatické buňce. Transport glukózy do intracelulárního prostoru glukozovým transportérem Glut2. Glukózový metabolismus (Gck – glukokináza a Pcx – Pyruvát karboxyláza). Biosyntéza inzulinu (Ero1b a Slc30a8 – proteiny zodpovědné za biosyntézu inzulinu) KATP – ATP-dependentní draslíkový kanál.

2. Cíl

Tato práce je součástí projektu skupiny Strukturní biologie spadající do oboru biochemie a molekulární biologie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., který je zaměřen na strukturní charakterizaci transkripčního faktoru Nkx6.1.

Cíle bakalářské práce:

- Literární úvod
- Rekombinantní příprava, purifikace a biofyzikální charakterizace ^{13}C - ^{15}N izotopově obohaceného Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎.
- Přirazení NMR rezonancí jader hlavního řetězce Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ a charakterizace prvků sekundárních struktury.
- Charakterizace vazby fragmentu DNA k Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ pomocí NMR.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Chemikálie

2-merkapt ethanol	Sigma-Aldrich, USA
Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin	Biotika, Slovenská republika
Bromfenolová modř	Lachema, Česká republika
D ₂ O	Euriso-top, France
Deoxycholát sodný (DOC)	Sigma-Aldrich, USA
D-Glukóza- ¹³ C ₆ , ≥99%	Cambridge isotope laboratories, UK
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	Sigma-Aldrich, USA
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Dodecyl síran sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Dusičnan stříbrný	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Penta, Česká republika
Ethyl glucuronide (ETG)	Carbosynth, UK
Ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA)	Serva, Německo
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Švýcarsko
Formaldehyd	Lachema, Česká republika
Glycerol	Penta, Česká republika

Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Hydroxid sodný	Lachema, Česká republika
Chlorid hořečnatý (dodekahydrát)	Lachema, Česká republika
Chlorid sodný	Lachema, Česká republika
Imidazol	Fluka, Švýcarsko
Kyselina chlorovodíková	Lachema, Česká republika
Kyselina octová	Lachema, Česká republika
Methanol	Penta, Česká republika
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
N,N'-metylen-bis(akrylamid) (BIS)	Fluka, Švýcarsko
Persíran amonný	Sigma-Aldrich, USA
Síran amonný- ¹⁵ N, ≥99%	Cambridge isotope laboratories, UK
Thiosíran sodný	Sigma-Aldrich, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, USA
Triton X 100	Merck, Česká republika
Uhličitan sodný	Penta, Česká republika

3.1.2. Enzymy a oligonukleotidy

TEV proteáza (rekombinantně připravena ve školící laboratoři, obsahuje His₆ kotvu na N-konci)

Lysozym chlorid (Sigma-Aldrich, USA)

5' CCTTAATTACC 3' (Sigma-Aldrich, USA)

5' GGTAATTAAGG 3' (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.3. Bakteriální kmeny a expresní plazmidy

***Escherichia coli* BL21 (DE3)** (New England BioLabs, Velká Británie): *E. coli* s DE3 profágem λ , nesoucím gen T7 RNA polymerasy pod transkripční kontrolou promotoru P_{lac}UV5; postrádá membránovou proteázu OmpT a cytoplasmatickou proteázu lon; je uzpůsoben k expresi rekombinantních proteinů

p1300: plazmid pro heterologní expresi Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ obsahuje syntetický gen (získaný v Eurofins, Německo) kódující Nkx6.1 (aa 226-312) ve standardním expresním vektoru typu pET. Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ je pod kontrolou indukovatelného T7 promotoru (pocházejícího z fága T7) a poskytuje rekombinantní produkt ve formátu: histidinová kotva (6xHis) – štěpné místo pro TEV proteázu – Nkx6.1. Po odštěpení histidinové kotvy zůstává na N-konci produktu 5 aminokyselinových zbytků SNAAS.

3.1.4. Použité pufrы a media

TRANSFORMACE PLAZMIDOVOU DNA A HETEROLOGNÍ EXPRESE

LB (*Luria-Bertani*) médium: 10 mg/ml Bacto Trypton (Difco, USA); 5 mg/ml Yeast Extract (Difco, USA); 5 mg/ml chlorid sodný

Minimální médium: 1 g/l (¹⁵NH₄)₂SO₄, 4 g/l ¹³C glukóza

IZOLACE ROZPUSTNÉHO PROTEINU Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎

Lyzační pufr: 50mM Tris-HCl, pH 7,3; 500mM NaCl, 1mM PMSF

CHELATAČNÍ CHROMATOGRAFIE NA HISTRAP NOSIČI

Ekvilibrační pufr: 50mM Tris-HCl, pH 7,3; 500mM NaCl

Promývací pufr: 50mM Tris-HCl, pH 7,3; 2M NaCl

Eluční pufr: 50mM Tris-HCl, pH 7,3; 500mM NaCl, 500mM imidazol

ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

Elektrodový pufr: 20mM Tris-HCl, pH 8,3; 200mM glycin, 0,1% (w/v) SDS

Vzorkový pufr: 125mM Tris pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (v/v) bromfenolová modř; v případě potřeby redukujících podmínek přidán 10% (v/v) 2-merkapt ethanol

SUŠENÍ GELŮ

Sušicí roztok: 20% ethanol a 3% glycerol

DETEKCE STŘÍBREM

Fixační roztok: 12% (v/v) CH₃COOH, 50% (v/v) methanol, 0,05% (v/v) formaldehyd

Barvicí roztok: 12mM AgNO₃, 0,075% (v/v) formaldehyd

Vyvolávací roztok: 570mM Na₂CO₃, 0,05% (v/v) formaldehyd, 16μM Na₂S₂O₃

GELVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAPHIE

Ekvilibrační pufr: 25mM NaH₂PO₄, pH 6,5; 100mM NaCl, 0,01% NaN₃

3.1.5. Ostatní materiál

- standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE Broad Range (Bio-Rad, USA)
- standard molekulových hmotností pro gelovou chromatografii, Sigma-Aldrich, USA
- přírodní celofán na sušení gelů po SDS-PAGE (Pemar, Česká republika)
- chromatografický nosič HisTrap High Performance (Sigma-Aldrich, USA)
- Superdex 200 10/300 GL Tricorn (Amersham Biosciences, Velká Británie)
- koncentrátoři Microcon nebo Amicon Ultra (Millipore, USA)

3.1.6. Přístroje

souprava pro elektroforézu

Mighty small II SE250 (Hoefer Scientific Instruments, USA)

Zdroj EV243 (Consort, Belgie)

centrifugy

Hettich EBA 12R, rotor 1412 (Zentrifugen, Německo)

Hermle Z 323 K (Německo)

Mini Spin (Eppendorf, Německo)

Heraeus Multifuge 3S-R (Thermo Electron Corporation, Německo)

Beckman J-21M, rotory JA-14, JA-21 (USA)

RC-3B, rotor H 4000 (Sorvall Instruments, USA)

spektrometry

Ultrospec 3100*pro* UV/Visible

Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Velká Británie)

NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA)

850 MHz Bruker AVANCE III

předvážky

Kern PRS 620-3 (Německo)

Adventure TM Pro AV2102CM (O'haus, USA)

váhy

Owa labor (VEB Wägetechnik Rapido, Německo)

Adventure TM Pro AV213CM (O'haus, USA)

sonikátory

Sonic Dismembrator (Dynatech, Francie)

třepačka	Rotamax 120 (Heidolph Instruments, Německo)
pH metr	GMH 3531 (Greisinger Electronic, Německo)
termostaty	TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) Sanyo CO2 Incubator MCO-ATAI (Japonsko)
vodní lázeň	GRANT (P-lab, Česká republika)
vortex	MS2 Minishaker (Schoeller instruments, Česká republika) Vortex (vývojové dílny ČSAV, Česká republika)
magnetická míchačka	Jenway 1000 (Hotplate and Stirrer, Velká Británie)
autokláv	Unisteri HP 336 – 1 (Německo)
inkubátor	SANYO CO2 Incubator MCO-175 (Japonsko)
fázově kontrastní mikroskop	Carl Zeiss Jena (Německo)
kapalinové chromatografy	Äkta basic (Amersham Biosciences, Velká Británie) Äkta FPLC GE Healthcare Life Sciences; sběrač frakcí GE Frac-950 (Velká Británie)
Termální cykler	MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (USA)

3.2. Metody

3.2.1. Transformace bakterií plazmidovou DNA

Transformace byla provedena metodou teplotního šoku. Při procesu transformace byl smíchán 1 μ l plazmidové DNA se 100 μ l bakteriální suspenze kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3). Tato směs byla inkubována 30 minut na ledu, poté 45 s ve vodní lázni temperované na 42 °C a opět 2 minuty na ledu. Směs bakteriální suspenze a plazmidové DNA byla zaočkována do 900 μ l LB media. Výsledná suspenze byla 1 hodinu inkubována při 37 °C za kontinuálního třepání (200 ot./min).

Inkubovaná bakteriální suspenze byla rozetřena na LB agarových plotnách s ampicilinem (100/ μ g/ml) a 1% glukózou. Na plotnu o průměru 20 cm obsahující 150 ml agaru bylo rozetřeno 300 μ l bakteriální suspenze. Plotny byly přes noc inkubovány při 37°C.

3.2.2. Heterologní exprese Nkx6.1

Kolonie transformovaných bakterií (dle kapitoly 3.2.1) byly smyty cca 7 ml LB media. LB medium obsahovalo ampicilin (0,1 mg/ml) a 0,4 % (v/v) glycerol. Inokulum bylo proměřeno na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro* a byla získána optická denzita inokula při 550 nm (OD_{550nm}). Poté bylo inokulem zaočkováno vždy 500 ml LB media s ampicilinem a glycerolem ve 2l Erlenmeyerových baňkách. Výsledná hodnota OD_{550nm} v Erlenmeyerových baňkách byla okolo 0,1.

Bakteriální kultury *E. coli* byly inkubovány při teplotě 37 °C za neustálého třepání (200 ot./min) v rotačním inkubátoru Gallenkamp. Každou hodinu bylo během kultivace měřeno OD_{550nm} . Po dosažení hodnoty OD_{550nm} cca 1,0 byla media vytemperována na teplotu 20 °C a indukována exprese přidavkem ETG do finální koncentrace 0,4 mmol/l. Bakteriální kultury byly dále pěstovány po dobu 4 h za stálé kontroly hodnoty OD_{550nm} . Buněčná biomasa byla po skončení kultivace oddělena centrifugací (4000 ot./min, 25 min, 4 °C, Sorvall RC-3B, rotor H 4000) a pelety byly zmrazeny v -20 °C k dalšímu zpracování.

Kontrola ukládání rekombinantního proteinu v inklusních tělískách byla prováděna pozorováním vzorků odebraných během kultivace pomocí optického fázově kontrastního mikroskopu (Carl Zeiss). Rekombinantní protein nebyl v inkluzních tělískách pozorován.

3.2.3. Heterologní exprese izotopově obohaceného ^{13}C - ^{15}N Nkx6.1

Izotopově obohacený ^{13}C - ^{15}N Nkx6.1 byl připraven v minimálním médiu s použitím ^{13}C glukózy a ^{15}N síranu amonného. Minimální médium obsahovalo ampicilin (0,1 mg/ml). K zaočkování se použila bakteriální suspenze, připravená již dříve a heterologní exprese byla provedena obdobným způsobem jako v případě izotopově neobohaceného proteinu (kapitola 3.2.2 str. 26).

3.2.4. Disrupce buněk

Buněčná biomasa byla resuspendována v lyzačním pufru, 10 ml/g biomasy. Poté byla třikrát zamražena a rozmražena za účelem rozbití bakteriálních stěn. Po posledním rozmražení byl přidán lysozym (1% (w/v)) k narušení peptidoglykanové stěny a směs byla míchána 30 min při 37 °C. Poté bylo přidáno 1 % DOC (w/v) a mícháno 20 minut na ledové lázni. Po míchání byl bakteriální lyzát sonikován na sonikátoru Dynatech Sonic Dismembrator při 60% výkonu za neustálého intenzivního chlazení. Cytosol uvolněný z rozbitých buněk byl oddělen centrifugací (4 °C, 12000 rpm, 20 min, Beckmann J-21M) a byl použit k izolaci proteinu. Sediment byl opětovně resuspendován v lyzačním pufru a znovu sonikován kvůli maximalizaci výtěžku.

3.2.5. Elektroforéza

3.2.5.1. SDS-PAGE

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS PAGE) [28] byla provedena podle Laemmliho [29] na aparatuře Mighty Small II SE 250. Gel se skládal z dělicího gelu, z 10% nebo 15% (w/v) AA a BIS v hmotnostním poměru BIS:AA 1:36 375mM Tris-HCl pH 8,8; 1mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% SDS; 0,1% (v/v) TEMED a 0,1% persíran amonný, kterým byla iniciována polymerace. Zaostřovací gel byl složen z 5% AA a BIS v hmotnostním poměru BIS:AA 1:36 1; 125mM Tris-HCl pH 6,8; 1mM EDTA; 0,5% (v/v) glycerol; 0,1% SDS; 0,1% TEMED a 0,1% persíran amonný. Rozměry gelů byly 80 x 70 x 0,75 mm.

Poté, co směs zaostřovacího a dělicího gelu plně zpolymerovala, byly gely připevněny do vertikální polohy do přístroje Mighty Small II SE 250 a zality elektrodovým

pufrem. Vzorky proteinu byly před nanesením na gel smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 1:2 a krátce povařeny na vodní lázni (3-5 min). Poté byly vzorky krátce centrifugovány (12000 ot./min., 1 min, lab. teplota; centrifuga Eppendorf MiniSpin). Elektroforéza byla prováděna za laboratorní teploty při výkonu 3 W na zaostřovací gel a 6 W na dělicí gel.

Jako standard molekulových hmotností byla používána komerční směs proteinů „Broad Range“ (Biorad), která obsahovala myosin (200 kDa), β -galaktosidasu (116,3 kDa), fosforylasu b (97,4 kDa), sérový albumin (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), karbonickou anhydrasu (31 kDa), trypsinový inhibitor (21,5 kDa), lysozym (14,4 kDa) a aprotinin (6,5 kDa).

3.2.5.2. Detekce stříbrem

Prvním krokem byla fixace gelu ve fixačním roztoku po dobu 1 hodiny. Následně byl gel 3x omýván v roztoku 50% (v/v) methanolu po dobu 5 min. dále byl po dobu 20 s omýván 0,8mM roztokem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a třikrát opláchnut destilovanou vodou. Poté byl gel přenesen do barvicího roztoku, kde byl ponechán 20 min. Po 20 minutách v barvicím roztoku byl gel 3x opláchnut destilovanou vodou a byl vložen do vyvolávacího roztoku. Poté bylo barvení zastaveno roztokem 12% (v/v) kyseliny octové a 50% (v/v) methanolu a gel uchován v 50% (v/v) methanolu.

3.2.5.3. Sušení gelů

Kvůli archivačním a dokumentačním účelům byly gely máčeny 10 minut v sušicím roztoku a sušeny v sušicím rámečku.

3.2.6. Chromatografické metody

3.2.6.1. Chelatační chromatografie

Jako první purifikační krok byla zvolena chelatační chromatografie na koloně HisTrap. Chromatografická stanice FPLC Äkta Prime a kolona byly používány při laboratorní teplotě. Nanášený vzorek byl chlazen na ledu a sbírané frakce byly opět sbírány na ledu. Kolona o objemu 5 ml byla nejprve promyta přibližně 50 ml destilované vody a poté ekvilibrována v ekvilibračním pufru. Následně byl na kolonu nanesen vzorek s konstruktem Nkx6.1. Kolona byla promývána promývacím pufrem. V posledním kroku

se z kolony uvolnil vzorek gradientem 0-100% elučního pufru. Frakce byly jímány po 5 ml a následně analyzovány na SDS-PAGE.

Frakce s detekovaným proteinem byly spojeny a převedeny dialýzou do pufru o složení 25mM NaH₂PO₄, pH 6,5; 100mM NaCl, 0,01% NaN₃.

3.2.6.2. Štěpení TEV proteázou a chelatační chromatografie

Před dalším purifikačním krokem byla odštěpena histidinová kotva. K proteinovému roztoku byla přidána TEV proteáza v poměru 1:50 (v/v) k substrátu. Roztok byl ponechán do druhého dne za teploty 4 °C a neustálého míchání na magnetické míchačce. Poté byla opakována chelatační chromatografie popsaná v kapitole 3.2.6.1., str. 28 za účelem oddělení odštěpené histidinové kotvy od proteinového konstruktu.

3.2.6.3. Gelová permeační chromatografie

Jako třetí purifikační krok byla provedena gelová permeační chromatografie. Byla vybrána kolona vhodná pro rozdělení globulárních proteinů podle molekulové hmotnosti v intervalu 10 – 600 kDa (Superdex 200 10/300 GL Tricorn o objemu 23 ml). Kolona byla instalována na FPLC stanici Äkta Basic. Jako mobilní fáze byl použit filtrovaný a odvzdušněný ekvilibrační pufr. Kolona byla nejdříve ekvilibrována v tomtéž pufru, a poté byl nanesen vzorek s cíleným proteinem určený k separaci. Průtok kolony byl nastaven na 0,5 ml/min. Eluční profil byl sledován spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm.

Kolona byla nejdříve kalibrována standardem molekulových vah, který obsahoval proteiny dextran blue (2 MDa), hovězí sérový albumin (66 kDa), karbonická anhydrasa (29 kDa), cytochrom C (12,4 kDa) a aprotinin (6,5 kDa). Jako mobilní fáze byl pro kalibraci použit filtrovaný a odvzdušněný 50mM Tris pH 7,5; 100mM chlorid sodný.

3.2.7. Příprava oligonukleotidového duplexu DNA

Duplex DNA o sekvenci CCTTAATTACC byl připraven pracovníky skupiny Strukturní biologie ÚOCHB následujícím postupem. Byla smíchána ekvimolární množství komplementárních oligonukleotidů rozpuštěných v pufru 20mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl. Roztok byl zahříván v přístroji MJ Research PTC-200 Thermal Cycler na 95°C po dobu 5 minut a poté ponechán chladnout po dobu 60 minut k 5°C. Výsledný duplex byl skladován při teplotě -20°C.

3.2.8. NMR spektroskopie

3.2.8.1. Příprava NMR vzorku

Frakce obsahující cílený protein s nejvyšší čistotou byly spojeny a koncentrovány až na výslednou koncentraci 930 μM . Koncentrování bylo provedeno ultrafiltrací na centrifuze Hermle Z 323 K pomocí centrifugačních filtrů s membránou o limitní velikosti pórů 3 000 Da pro globulární proteiny (Millipore). Koncentrace byla zjištěna spektrofotometricky na základě měření v UV oblasti při vlnové délce 280 nm na přístroji NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Izotopově značený Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ byl dialyzován do pufru o složení 25mM NaH₂PO₄, pH 6,5; 100mM NaCl, 0,01% NaN₃. Před měřením bylo do vzorku přidáno 5% D₂O. Výsledný objem vzorku v 5 mm NMR Shigemi kyvetě byl 350 μl o koncentraci proteinu 930 μM .

3.2.8.2. NMR spektroskopie

Všechna NMR spektra byla naměřena při teplotě 298 K na přístroji 850 MHz Bruker AVANCE III spektrometr, který je vybavený kryosondou na měření jader ¹⁵N-¹³C-¹H. Data byla snímána pracovníky skupiny Strukturní biologie ÚOCHB.

S cílem přiřadit rezonance atomů hlavního řetězce proteinu Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ a kvalifikaci interakce fragmentu DNA s Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ byly změřeny série dvoudimenzionálních a třídimeznionálních experimentů. Experimenty potřebné pro přiřazení hlavního řetězce proteinu byly ¹H-¹⁵N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, CBCA(CO)NH, HNCACB. Pro naměření a zpracování všech spekter byl použit program Bruker's TopSpin™. Rezonanční přiřazení signálů ve spektrech Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ bylo provedeno manuálně v programu Sparky (verze 3.114) (kapitola 4.2, str. 34) [30]. Následně byla provedena predikce sekundárních struktur v programu TALOS+ [31] viz kapitola 4.2, str. 37.

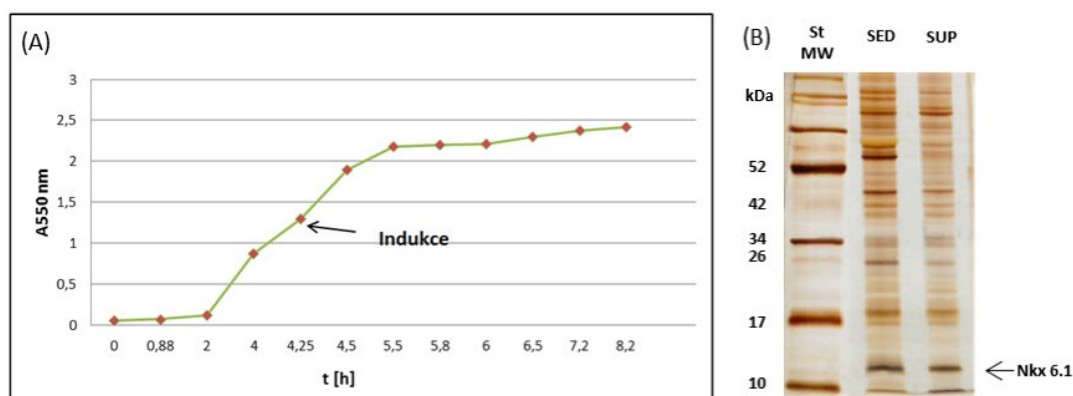
3.2.8.3. Interakce s DNA

Pro sledování interakce Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ s duplexem DNA byla naměřena ¹H-¹⁵N HSQC spektra volného proteinu a proteinu se vzrůstající koncentrací DNA. DNA byla k 160 μl proteinu o koncentraci 930 μM titrována v molárních poměrech 1:0,3, 1:0,6 a 1:0,9. V těchto spektrech byly následně sledovány změny poloh signálů amidových skupin hlavního řetězce (viz kapitola 4.3, str. 37).

4. Výsledky

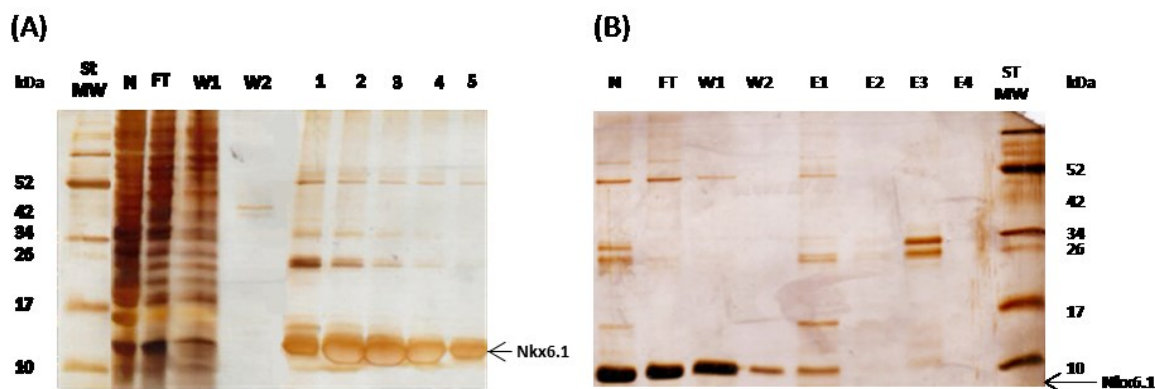
4.1. Příprava a biofyzikální charakterizace Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎.

Kultivací *Escherichia coli* BL21 (DE3) nesoucích plazmid pro expresi Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ v 2 l LB média bylo vyprodukováno 13,2 g buněčné biomasy, která byla následně použita k purifikaci rekombinantního proteinu (kapitola 3.2.2 str. 26). Růstová křivka je zobrazena na Obrázku 5 (A), str. 31. Výsledný produkt připravený heterologní expresí je protein o délce 86 aminokyselin a molekulovou váhou 10588Da, na jehož N-konci se nachází histidinová kotva (6xHis) a štěpné místo pro TEV proteázu (ENLYFQ↓S). Produkt se nacházel převážně v rozpustné formě v cytoplazmě bakteriálních buněk, ze které byl posléze purifikován (Obrázek 5 (B), str. 31).



Obrázek 5 (A) Růstová křivka bakterií exprimujících Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ (Mw 10588 Da). (B) SDS-PAGE analýza obsahu proteinu v bakteriálních buňkách. ST MW – Standart molekulových vah (z angl. standart molecular weight), SED – sediment, nerozpustná frakce bakteriálních buňek, SUP – supernatant, rozpustná cytosolická frakce. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ s histidinovou kotvou.

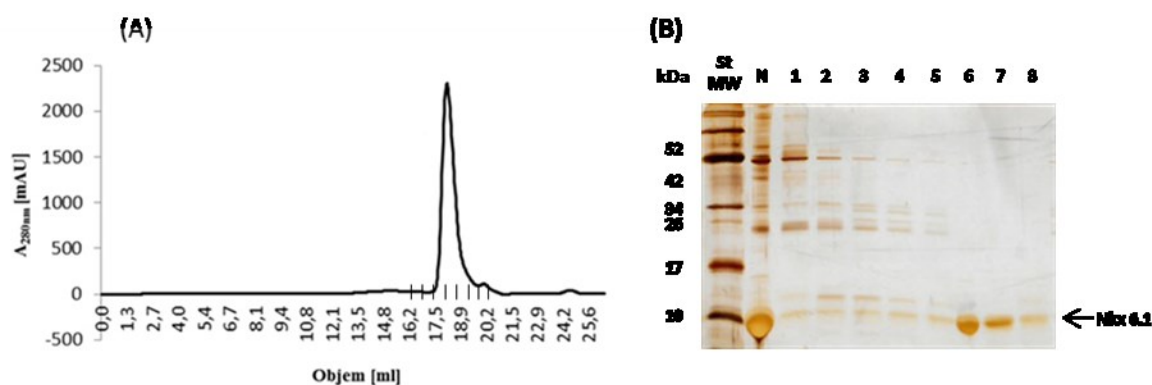
Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ byl díky histidinové kotvě velmi účinně purifikován využitím chelatační chromatografie na koloně HisTrap. Protein byl z kolony eluován gradientem 0-500 mM imidazolu v 5 frakcích o objemu 5 ml (Obrázek 6 (A), str. 32) (kapitola 3.2.6.1). K další purifikaci byly využity frakce 1-5. Histidinová kotva byla odštěpena TEV proteázou. Dále byl proteinový roztok znovu nanesen na kolonu HisTrap za účelem oddělení odštěpené histidinové kotvy a TEV proteázy (Obrázek 6 (B), str. 32)



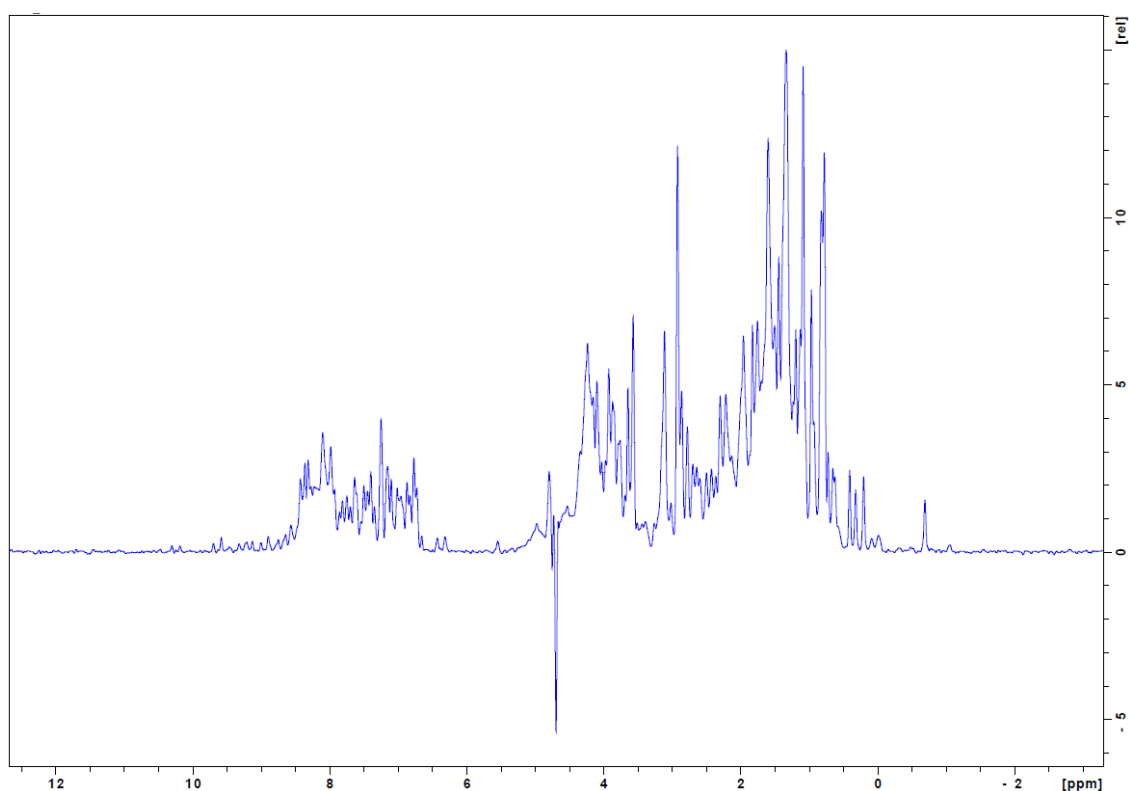
Obrázek 6 SDS-PAGE analýza průběhu purifikace pomocí chelatační chromatografie. (A) První krok purifikace Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ z bakteriálního lyzátu: ST MW – standart molekulových vah, N – nános, FT – proteklá frakce (z angl. flowthrough), W1, W2 – frakce po promytí promývacím pufrem, 1-5 – frakce, eluce 0-500mM imidazolem. (B) Druhý krok purifikace po odštěpení histidinové kotvy z Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎: ST MW – Standart molekulových vah, N - nános, FT – proteklá frakce, W1, W2 – frakce po promytí promývacím pufrem, E1, E2, E3, E4 – frakce elucích 500mM imidazolem. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ s histidinovou kotvou (panel A) a po jejím odštěpení (panel B).

Frakce FT a W1 obsahující Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ s odštěpenou histidinovou kotvou (Obrázek 6, str. 32) byly spojeny, koncentrovány a dále čištěny na koloně pro gelovou permeační chromatografii (kapitola 3.2.6.3, str. 29). Na chromatogramu (Obrázek 7 (A), str. 33) byl pozorován jeden symetrický vrchol při objemu 18 ml elučního pufru. Na základě provedené kalibrace odpovídá tento eluční objem zdánlivé molekulové váze 10,6 kDa, což je očekávaná molekulová váha Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎. Frakce z gelové permeační chromatografie byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 7 (B), str. 33). Koncentrace proteinu byla určena spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a činila 390 μ M. Konečný výtěžek Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ 6.1 po gelové permeační chromatografii činil 2,1 mg čistého proteinu z 1l LB media.

Pro biofyzikální charakterizaci proteinu bylo naměřeno 1D ^1H spektrum (Obrázek 8, str. 33). Signály ve spektru jsou rozptýleny přes širokou škálu chemického posuvu, což naznačuje přítomnost hydrofobního jádra proteinu a tedy správné sbalení rekombinantního proteinu.



Obrázek 7 (A) chromatogram z finální purifikace gelovou permeační chromatografií. Vertikálními čárkami jsou označeny jímáné frakce 1-8 (B) SDS-PAGE analýza frakcí. ST MW – Standart molekulových vah, N – nános, 1-8 – frakce. Šipkou je označen protein o velikosti odpovídající Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎.



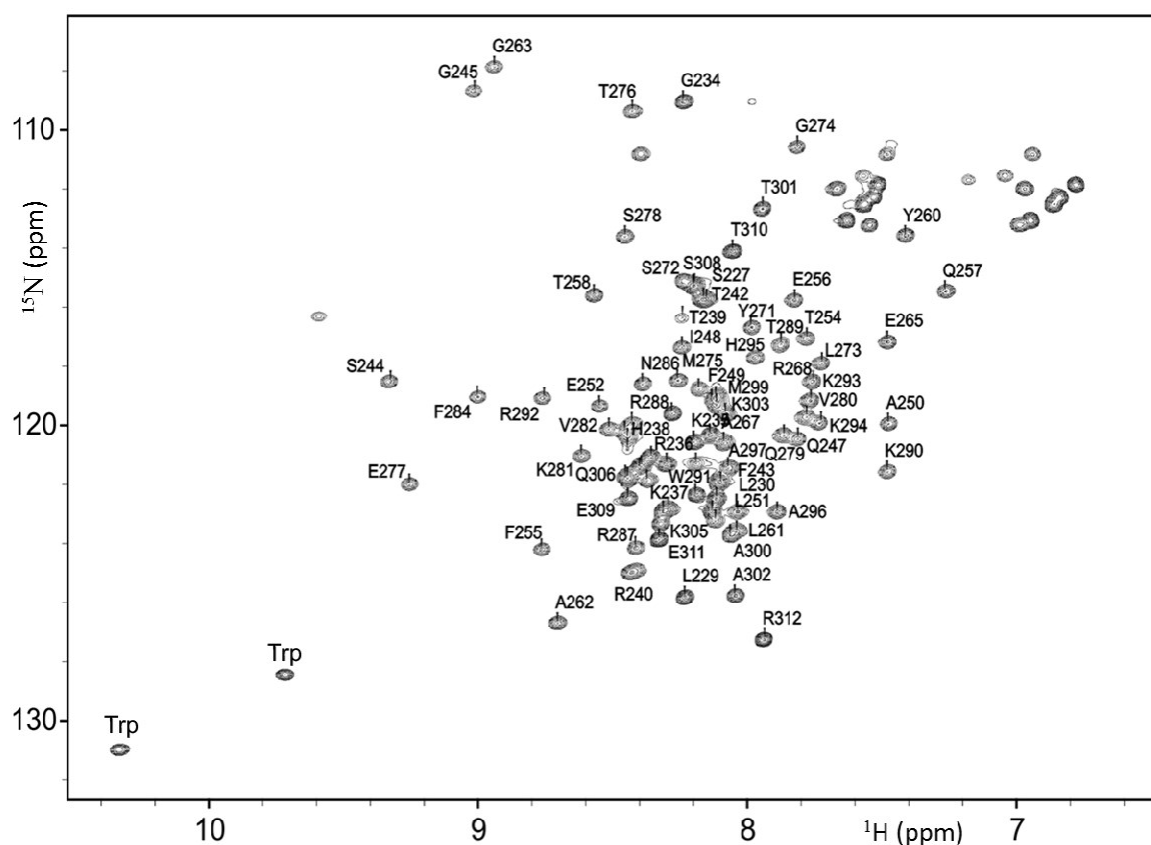
Obrázek 8 1D 1H spektrum Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎. Signály ve spektru jsou rozptýleny přes širokou škálu chemického posuvu, což naznačuje přítomnost hydrofobního jádra proteinu. Signály v oblasti záporného chemického posuvu značí přítomnost prvků terciální struktury proteinu.

4.2. Příprava ^{13}C - ^{15}N izotopově obohaceného Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ a přiřazení rezonancí hlavního řetězce

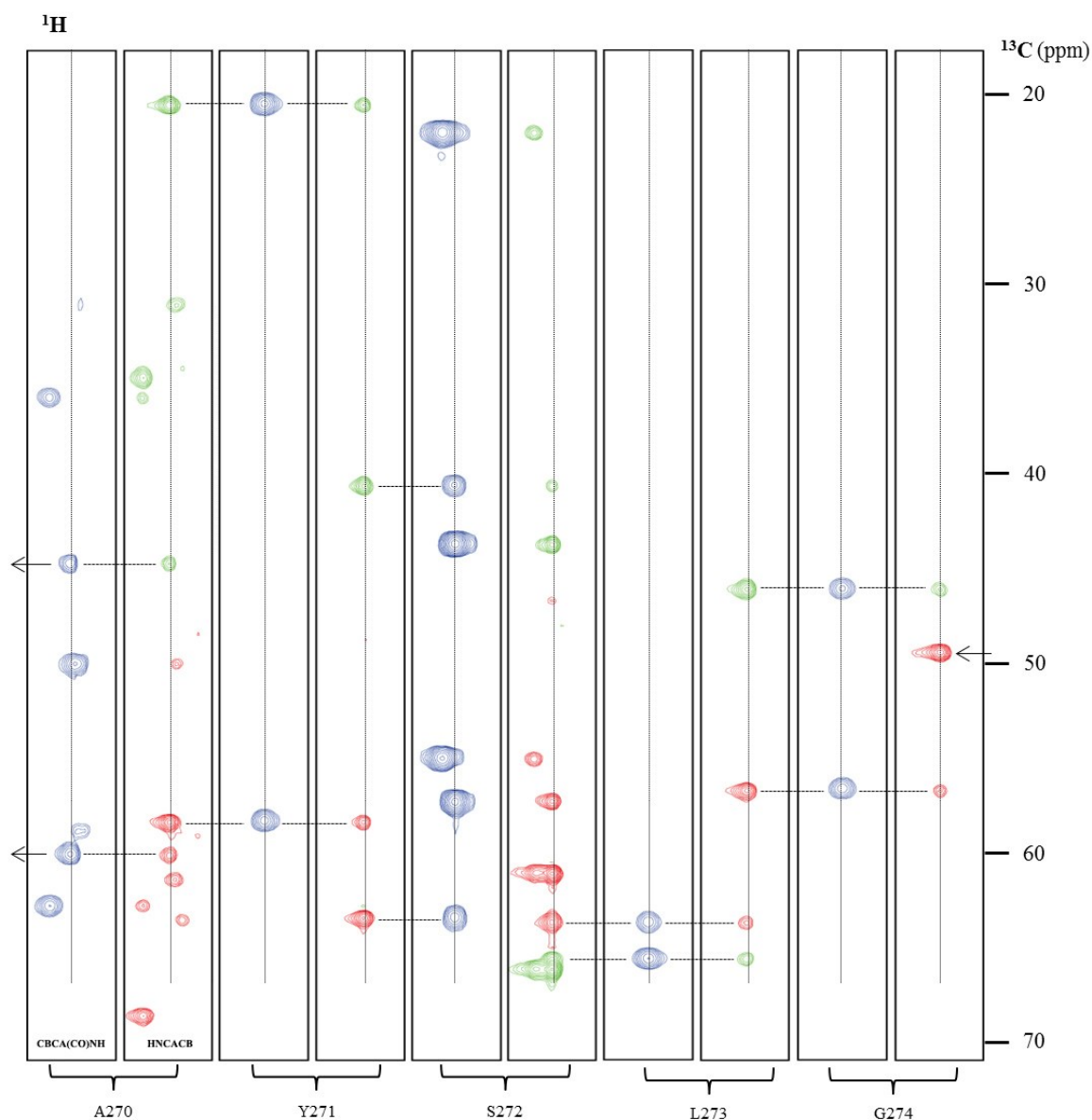
Podle optimalizovaného protokolu (kapitola 4.1, str. 31) byl v minimálním mediu s použitím ^{13}C glukózy a ^{15}N síranu amonného připraven izotopově obohacený ^{13}C - ^{15}N Nkx6.1 pro měření NMR experimentů. Výtěžek činil 1,1 mg na 1 l media.

Pro rezonanční přiřazení ^1H - ^{15}N HSQC spektra (Obrázek 9, str. 35) hlavního řetězce proteinu byla použita strategie využívající třídimenzionálních experimentů HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCA a HN(CO)CA. Počátečním krokem bylo nalezení tzv. startovních bodů, unikátních spinových systémů specifických aminokyselin. Tyto spinové systémy aminokyselinových zbytků byly navzájem propojeny s dalšími spinovými systémy pomocí spekter s korelacemi chemických posuvů amidických vodíků a dusíků s chemickými posuvy odpovídajícím uhlíkovým atomům C_α , C_β předcházející a následující aminokyseliny [32]. Arginin v poloze 241 na N-konci molekuly a glycin v poloze 264 na druhém α -helixu, nebyly v 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektru detekovány pro nedostatečnou intenzitu signálů, stejně tak u všech 3D spektrech. Ve spektru ^1H - ^{15}N HSQC jsou v oblasti 9,5 – 10,5 ppm na vodíkové rezonanci a 125 – 132 ppm na dusíkové rezonanci signály, které nepochází z amidových skupin peptidových vazeb, ale z indolových kruhů tryptofanů. Neznačené signály v oblasti 6,5 – 7,2 ppm na vodíkové rezonanci a 110 – 115 ppm na dusíkové rezonanci pochází od amidových skupin postranních řetězců argininu, asparaginu a glutaminu.

Jako startovní body byly zvoleny aminokyseliny, které lze snadno určit. Například spinový systém glycinu neobsahuje na rozdíl od ostatních aminokyselin C_β uhlík a jeho C_α uhlík se nachází v intervalu 43-45 ppm. Dalším jednoduše identifikovatelným startovním bodem je spinový systém alaninu, protože signály jeho C_β uhlíků se jako jediné vyskytují v oblasti 15-20 ppm. Ve spinových systémech serinů a threoninů se vyskytují signály C_β uhlíků v intervalu 50-60 ppm, tedy nad hodnotami chemických posuvů C_α uhlíků (60-70 ppm). Ostatní aminokyseliny byly určeny podle intervalu chemických posuvů, kde leží jejich C_α a C_β uhlíky. Dalším spojovacím prvkem byla kombinace spekter s korelací karbonylových atomů aminokyseliny pouze předcházející (HNCO) a aminokyseliny přecházející i vlastní (HNCACO). Na Obrázku 10, str. 36 je zobrazen příklad krátké přiřazené sekvence A270 až G274 se specifickými aminokyselinami, které byly zvoleny jako startovní body.

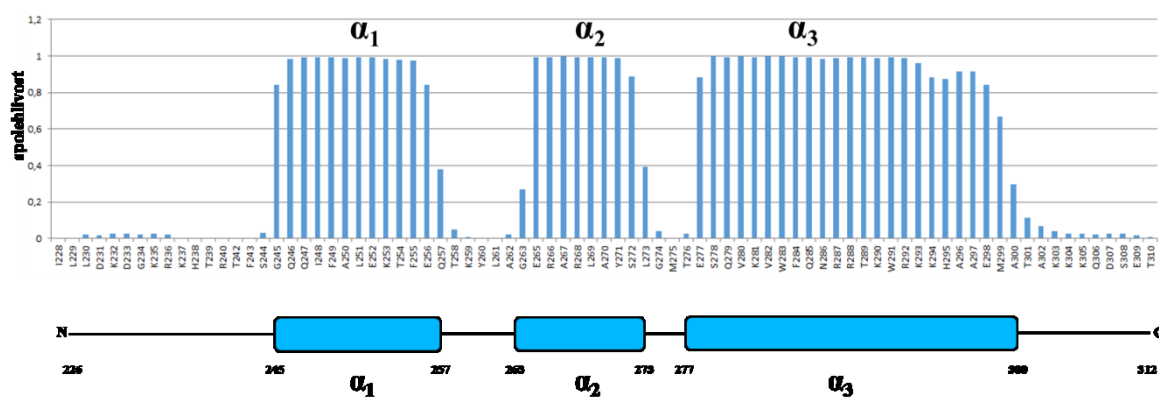


Obrázek 9 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektrum ^{13}C - ^{15}N izotopově obohaceného Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ s přiřazenými rezonancemi NH-skupin. Signály, které pocházejí z indolových kruhů tryptofanů jsou označeny zkratkou Trp. Neoznačené signály patří amidickým skupinám postranních řetězců asparaginů, glutaminů a argininů. Přiřazení rezonancí bylo provedeno manuálně v programu Sparky.



Obrázek 10 Příklad krátkého sekvenčního přiřazení rezonancí hlavního řetězce proteinu A270 až G274. Výřezy z 3D spekter CBCA(CO)NH na dusíkové rezonanci odpovídají aminokyselině popsané ve spodní části obrázku. Přerušovaná čára značí sekvenční napojení aminokyseliny v HNCACB spektru s předcházející aminokyselinou v CBCA(CO)NH spektru. Zelenou barvou jsou vyznačeny C_β uhlíky (negativní signály), červenou C_α uhlíky (pozitivní signály) a modrou spinové systémy, korelující uhlíky předcházející aminokyseliny. Šipky znázorňují směr přiřazování aminokyselin.

Díky přiřazení rezonancí atomů hlavního řetězce Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ bylo možno spolehlivě předpovědět prvky sekundárních struktur proteinu [33, 34]. Dihedrání úhly hlavního řetězce proteinu byly predikovány v programu TALOS+. Pro predikci úhlů Ψ a ϕ byly použity chemické posuvy atomů H^N , C_α , C_β , CO a N. Program TALOS+ předpověděl tři α -helikální úseky v rozmezí G245-Q257, G263-L273 a E277-A300, což naznačuje, že Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ patří do doménové rodiny HD. Výsledek výpočtu program TALOS+ je na Obrázku 11, str. 37.

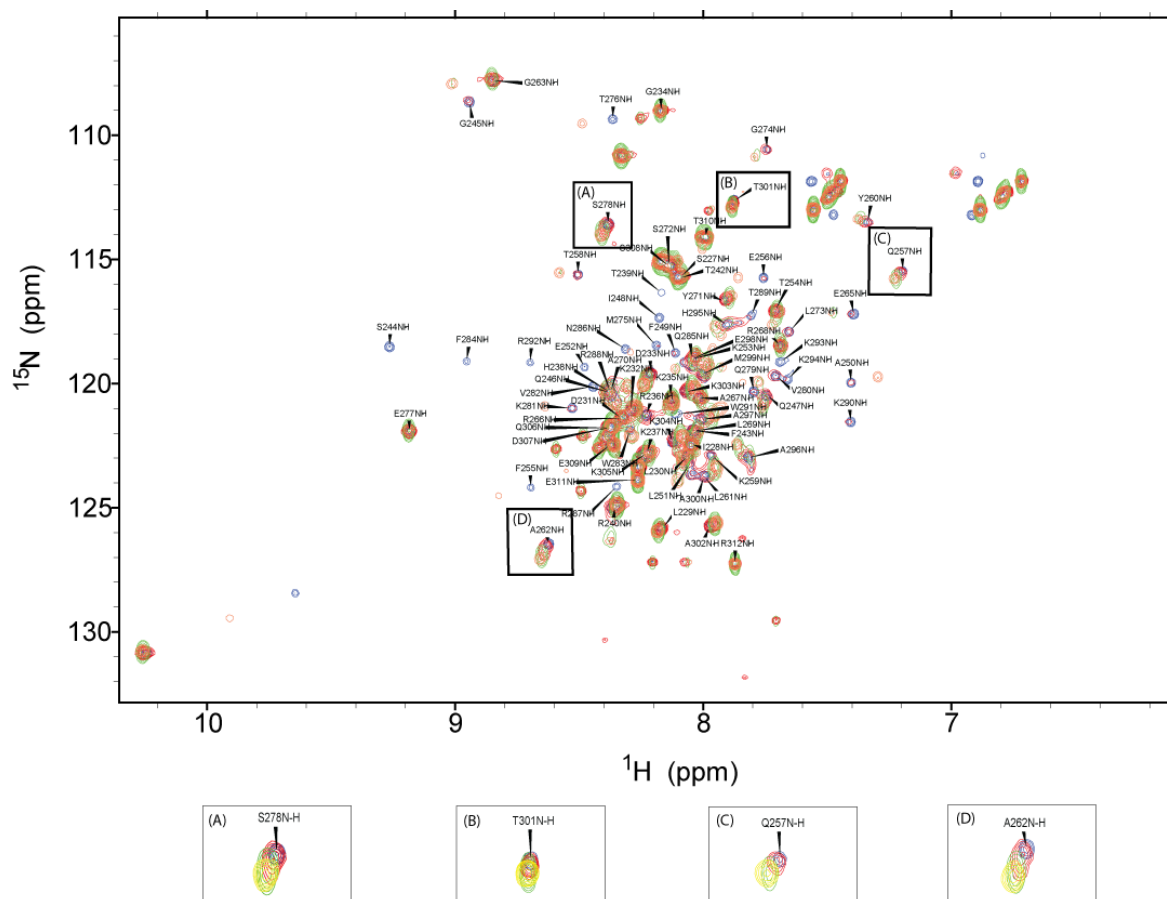


Obrázek 11 Graf předpovězené sekundární struktury Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ programem TALOS+. Popisky α_1 , α_2 a α_3 označují α -helikální struktury. α_1 – G245-Q257, α_2 – G263-L273 a α_3 – E277-A300.

4.3. Interakce fragmentu DNA s Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎

Pro sledování vazby Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ k DNA byl použit oligonukleotidový duplex o sekvenci CCTTAATTACC. Nejprve bylo nasnímáno 1H - ^{15}N HSQC spektrum volného izotopově obohaceného ^{13}C - ^{15}N Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ a poté 1H - ^{15}N HSQC spektra po přidání postupně zvyšující se koncentrací DNA duplexu. DNA byla k izotopově obohacenému ^{13}C - ^{15}N Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ titrována v molárních poměrech 1:0,3, 1:0,6 a 1:0,9, kdy se změny chemických posuvů amidických skupin ustálily. Tento bod indikoval saturaci ligandem.

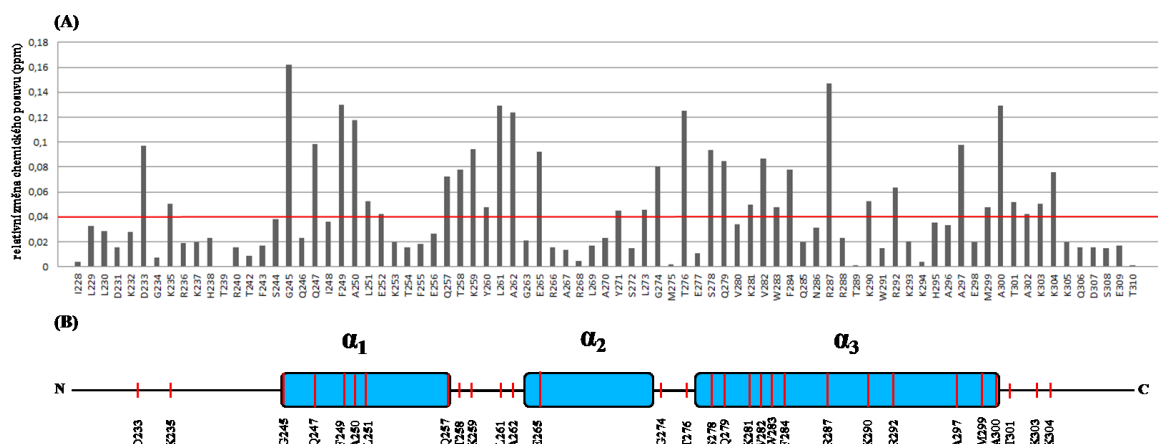
Změny chemických posuvů jednotlivých signálů ve spektru s přidáním ligandem indikovaly interakci a určily, které aminokyselinové zbytky se do interakce zapojily (Obrázek 12, str. 38) [35].



Obrázek 12 Porovnání 2D ^1H - ^{15}N HSQC spektra volného izotopově obohaceného ^{13}C - ^{15}N Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ – (modrá barva) s ^1H - ^{15}N HSQC spektry s postupně přibývající koncentrací DNA. DNA byla postupně titrována v koncentračních poměrech 1:0,3 – (červená barva), 1:0,6 – (zelená barva), 1:0,9 – (žlutá barva) k izotopově obohacenému ^{13}C - ^{15}N Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ – (modrá barva). V rámečcích jsou vyznačené spinové systémy, které se účastní interakce.

Ze spekter s postupně zvyšující se koncentrací DNA, byly z programu Sparky získány chemické posuvy spinových systémů všech aminokyselinových zbytků. Hodnoty chemických posuvů signálů volného proteinu byly odečteny od hodnot chemických posuvů signálů ze spektra, kde byl protein plně satureován DNA. Tento výpočet umožnil sledovat relativní změnu posuvů jednotlivých aminokyselin a určit, které jsou nejvýznamněji ovlivněny interakcí. Velikost změny posuvu přímo odpovídá míře ovlivnění interakce s danou aminokyselinou. Na Obrázku 13 (A), str. 39 je graf relativních změn chemických posuvů. Nejvýznamnější změny chemických posuvů spinových systémů aminokyselin, převyšující hodnotu směrodatné odchylky (0,04 ppm), byly identifikovány na začátku prvního α -helixu (G245, Q247, F249, A250, L251 a Q257) a těsně před začátku druhého (E265) a třetího α -helixu (S278, Q279, K281, V282, W283, F284, R287, K290, R292,

A297, M299 a A300). Další významné změny byly pozorovány na N-konci (D233 a K235) a C-konci molekuly (T301, K303 a K304). Polohy aminokyselin zúčastňujících se vazby jsou na Obrázku 13 (B), str. 39.



Obrázek 13 (A) Graf relativních změn chemických posuvů spinových systémů jednotlivých aminokyselin. Červenou čarou je vyznačena hodnota směrodatné odchylky (0,04 ppm). Aminokyseliny převyšující hodnotu směrodatné odchylky jsou vazbou významně ovlivněny Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ k DNA. (B) Rozložení sekundárních struktur v sekvenci proteinu a polohy aminokyselin, jejichž hodnoty relativních změn chemických posuvů převyšují vypočtenou hodnotu směrodatné odchylky (0,04 ppm). Symboly α_1 , α_2 a α_3 představují α -helikální struktury.

5. Diskuze

V této bakalářské práci byl úspěšně vypracován protokol na přípravu rekombinantního Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ (postup popsán v kapitole 4.1. str. 31). Výtěžek proteinu byl 2,1 mg na 1 l LB média. Následně byl podle protokolu připraven ¹³C-¹⁵N izotopově obohacený vzorek nezbytný pro strukturní a vazebné experimenty měřené metodou NMR. Výtěžek izotopově obohaceného vzorku činil 1,1 mg na 1 l minimálního média. Menší výtěžek izotopově obohaceného proteinu odpovídá faktu, že minimální medium neobsahuje stejné množství živin jako LB medium. Výtěžek byl dostatečný pro provedení NMR experimentů.

Rozložení NMR signálů přes širokou škálu chemického posuvu v 1D protonovém spektru Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ (Obrázek 8, str. 33) indikuje, že se jedná o globulární protein. Signály methylových protonů v oblasti záporného chemického posuvu naznačují přítomnost takzvaného hydrofobního jádra proteinu, kde zcela zanořené aromatické postranní řetězce silně ovlivňují chemický posuv blízkých methylových skupin. Rovněž v 2D ¹H-¹⁵N HSQC spektru byly signály amidových skupin rozptýleny, což dále potvrzuje, že se jedná o strukturovaný protein, ve kterém jsou polohy signálů ovlivněny vedle kovalentní struktury také třidimenzionální strukturou molekuly (Obrázek 9, str. 35).

Přiřazení rezonancí hlavního řetězce ¹³C-¹⁵N izotopově obohaceného Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ bylo provedeno postupem popsáním v kapitole 4.2, str. 34. Z celkového počtu 86 aminokyselin bylo přiřazeno 97,7 %. Arginin v poloze 241 a glycin v poloze 264 nebyly ve spektrech detekovány.

Byly předpovězeny tři úseky pravidelné α -helikální struktury o délce α_1 – 13, α_2 – 10 a α_3 – 23 aminokyselin (Obrázek 11, str. 37), což potvrzuje, že se jedná o homeodoménový protein. Homeodoménové proteiny jsou obecně složeny z tří α -helixů, z nichž C-koncový je považován za rozpoznávací helix zodpovědný za interakci s DNA.

Interakce Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ s DNA, konkrétně s duplexem o nukleotidové sekvenci CCTTAATTACC, byla sledována pomocí relativních změn chemických posuvů spinových systémů jednotlivých aminokyselin [35]. Bylo naměřeno ¹H-¹⁵N HSQC spektrum volného proteinu a následně ¹H-¹⁵N HSQC spektra s postupně vzrůstající koncentrací DNA duplexu. Aminokyseliny, jejichž hodnoty chemických posuvů převyšovaly hodnotu směrodatné odchylky, byly mapovány na předpovězenou sekundární strukturu proteinu, viz Obrázek 13(B), str. 39. Nejvýznamnější změny po vazbě DNA byly pozorovány pro aminokyselinový zbytek D229, situovaný na N-konci molekuly, pro zbytky D245, F249 a

A250 na začátku prvního α -helixu, dále pro L261 a A262 na rozvolněné části molekuly před začátkem druhého α -helixu, pro T276 na rozvolněné části před začátkem třetího α -helixu a pro zbytky R267 a A300 na třetím α -helixu (Obrázek 13, str. 39). Fakt, že aminokyselinové zbytky D233, L261, A262 a T276 nejsou součástí třetího, rozeznávacího helixu, jak udává literatura [9] naznačuje, že při interakci fragmentu DNA s Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ dochází ke konformačním změnám proteinu.

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární úvod o transkripčních faktorech a Nkx6.1, připravit ^{13}C - ^{15}N izotopově obohacený protein Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎, přiřadit rezonance atomů jeho hlavního řetězce, identifikovat prvky sekundární struktury na základě chemického posuvu a charakterizovat vazbu DNA pomocí NMR.

Optimalizace expresního a purifikačního protokolu byla nejprve provedena na nativním proteinu, poté byl protein exprimován v ^{13}C - ^{15}N izotopově obohaceném minimálním médiu a purifikován podle optimalizovaného protokolu. Získaný izotopově obohacený Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ byl využit k naměření spekter pro přiřazení rezonancí jader hlavního řetězce a ke studiu vazebného místa pomocí NMR spektroskopie. Na základě hodnot chemických posuvů těchto rezonancí byly předpovězeny tři α -helixy, které odpovídají strukturnímu uspořádání homeodomény. NMR experimenty odhalily, že do vazby Nkx6.1₍₂₂₆₋₃₁₂₎ na DNA se zapojuje zejména první α -helix. Ukázalo se též, že po vazbě DNA dochází ke konformačním změnám proteinu, které ovlivňují polohy signálů aminokyselin v částech molekuly, která se přímo vazby k DNA neúčastní.

7. Seznam použité literatury

1. Taylor, B.L., F.F. Liu, and M. Sander, *Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells*. Cell Rep, 2013. **4**(6): p. 1262-75.
2. Bruce Alberts, D.B., Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Základy buněčné biologie : úvod do molekulární biologie buňky*. 1998: Espero Publishing.
3. Ou, H.D., et al., *ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells*. Science, 2017. **357**(6349).
4. Kodíček Milan, V.O., Hynek Radovan, *biochemie*. 2015: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 416.
5. Donald Voet, J.G.V., *Biochemistry, 4th Edition*. 2011: Kaye Pace.
6. Geiman, T.M. and K.D. Robertson, *Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together?* J Cell Biochem, 2002. **87**(2): p. 117-25.
7. Clapier, C.R. and B.R. Cairns, *The biology of chromatin remodeling complexes*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 273-304.
8. Badia, D., et al., *The structure of phage phi29 transcription regulator p4-DNA complex reveals an N-hook motif for DNA*. Mol Cell, 2006. **22**(1): p. 73-81.
9. Yesudhas, D., et al., *Proteins Recognizing DNA: Structural Uniqueness and Versatility of DNA-Binding Domains in Stem Cell Transcription Factors*. Genes (Basel), 2017. **8**(8).
10. Raghavendra G. Mirmira†, Hirotaka Watada†‡ and Michael S. German†,§**, *β -Cell Differentiation Factor Nkx6.1 Contains Distinct DNA Binding Interference and Transcriptional Repression Domains*. J Biol Chem, May 12, 2000(275): p. 14743-14751.
11. Komazin-Meredith, G., et al., *Hopping of a processivity factor on DNA revealed by single-molecule assays of diffusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10721-6.
12. Kalodimos, C.G., et al., *Structure and flexibility adaptation in nonspecific and specific protein-DNA complexes*. Science, 2004. **305**(5682): p. 386-9.
13. Furini, S., P. Barbini, and C. Domene, *DNA-recognition process described by MD simulations of the lactose repressor protein on a specific and a non-specific DNA sequence*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(7): p. 3963-72.
14. Winter, R.B., O.G. Berg, and P.H. von Hippel, *Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 3. The Escherichia coli lac repressor--operator interaction: kinetic measurements and conclusions*. Biochemistry, 1981. **20**(24): p. 6961-77.

15. von Hippel, P.H. and O.G. Berg, *Facilitated target location in biological systems*. J Biol Chem, 1989. **264**(2): p. 675-8.
16. Halford, S.E., D.M. Gowers, and R.B. Sessions, *Two are better than one*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(9): p. 705-7.
17. Halford, S.E. and J.F. Marko, *How do site-specific DNA-binding proteins find their targets?* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(10): p. 3040-52.
18. Hu, T., A.Y. Grosberg, and B.I. Shklovskii, *How proteins search for their specific sites on DNA: the role of DNA conformation*. Biophys J, 2006. **90**(8): p. 2731-44.
19. Rigali, S., et al., *Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12507-15.
20. Hock, R., et al., *HMG chromosomal proteins in development and disease*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(2): p. 72-9.
21. Massari, M.E. and C. Murre, *Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(2): p. 429-40.
22. Norton, J.D., *ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 22): p. 3897-905.
23. Razin, S.V., et al., *Cys2His2 zinc finger protein family: classification, functions, and major members*. Biochemistry (Mosc), 2012. **77**(3): p. 217-26.
24. Hellman, L.M. and M.G. Fried, *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions*. Nat Protoc, 2007. **2**(8): p. 1849-61.
25. Holden, N.S. and C.E. Tacon, *Principles and problems of the electrophoretic mobility shift assay*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2011. **63**(1): p. 7-14.
26. Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 193-205.
27. Froguel, P., et al., *Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Nature, 1992. **356**(6365): p. 162-4.
28. Shapiro, A.L., E. Vinuela, and J.V. Maizel, Jr., *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. **28**(5): p. 815-20.
29. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
30. Lemak, A., et al., *A novel strategy for NMR resonance assignment and protein structure determination*. J Biomol NMR, 2011. **49**(1): p. 27-38.

31. Shen, Y., et al., *TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts*. J Biomol NMR, 2009. **44**(4): p. 213-23.
32. Wei, Q., et al., *NMR Backbone Assignment of Large Proteins by Using (13) Calpha-Only Triple-Resonance Experiments*. Chemistry, 2016. **22**(28): p. 9556-64.
33. Cornilescu, G., F. Delaglio, and A. Bax, *Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology*. J Biomol NMR, 1999. **13**(3): p. 289-302.
34. Schwarzing, S., et al., *Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(13): p. 2970-8.
35. Williamson, M.P., *Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding*. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 2013. **73**: p. 1-16.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]